

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

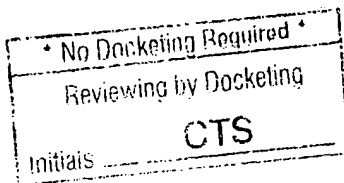


UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
09/975,136	10/10/2001	Dexu Zhu	524022000100	8877

25225 7590 03/24/2004
MORRISON & FOERSTER LLP
3811 VALLEY CENTRE DRIVE
SUITE 500
SAN DIEGO, CA 92130-2332



EXAMINER

ZUCKER, PAUL A

ART UNIT	PAPER NUMBER
----------	--------------


1621

23

DATE MAILED: 03/24/2004

PRIORITY ACKNOWLEDGMENT

- ☒ 1. Receipt is acknowledged of priority papers submitted under 35 U.S.C. 119. The papers have been placed of record in the file.
- ☐ 2. Applicant's claim for priority, based on papers filed in parent Application Number _____ submitted under 35 U.S.C. 119, is acknowledged.
- ☐ 3. The priority papers, submitted _____, after payment of the issue fee are
- ☐ acknowledged
While the priority claim or certified copy filed will be placed in the file record, neither will be reviewed and the patent when published will not include the priority claim.
See 37 CFR 1.55(a)(2).
 - ☐ not acknowledged since the processing fee in 37 CFR 1.17(i) has not been received.
- ☐ 4. For utility and plant applications filed on or after November 29, 2000, the priority claim is not entered because the claim was not presented within the time limit required by 37 CFR 1.55(a)(1). A petition to accept a delayed claim for priority under 35 U.S.C. 119(a) - (d) or (f), or 365(a) may be filed. See 37 CFR 1.55(c) and MPEP 201.14(a).

For 
Manager, Publishing Division
Office of Patent Publication
(703) 305-8388

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 日： 2001 09 26

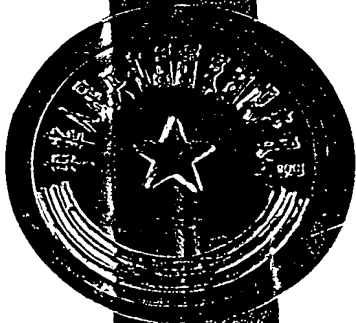
申 号： 01 1 42289.0

申 类 别： 发明

发明 名称： 治疗或预防细菌感染的方法和组合物

申 人： 朱德煦；村松睦；谢建树；程霓；王明伟

发明 设计人： 朱德煦；村松睦；谢建树；程霓；王明伟



中华人民共和国
国家知识产权局局长

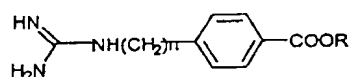
王 崇 川

2004 年 1 月 30 日

权利要求书

1. 一种化合物或其药物学上可接受的盐, 该化合物具有以下分子式

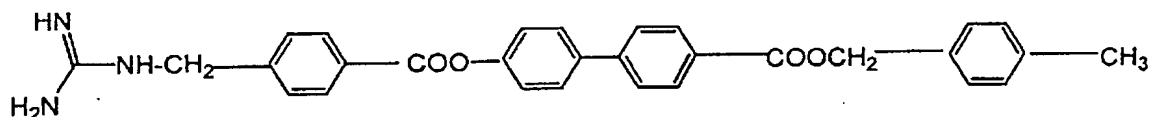
I:



其中 n 是 0-1 的整数, R 选自氢、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 芳基和



2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于其具有以下分子式 II:



3. 一种药物组合物, 该组合物含有权利要求 1 所述的化合物。

4. 如权利要求 3 所述的药物组合物, 其特征在于进一步含有药物学上可接受的载体和赋形剂。

5. 治疗或预防由幽门螺旋菌感染引起的疾病和紊乱的方法, 其特征在于包括给需要或愿意治疗或预防的对象给药有效量的权利要求 1 所述的化合物, 或其药物学上可接受的盐, 因而治疗或预防所述疾病或紊乱。

6. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于所述对象是哺乳动物。

7. 如权利要求 6 所述方法, 其特征在于所述哺乳动物是人。

8. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于包括给所述对象权利要求 2 所述的化合物或其药物上可接受的盐。

9. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于包括给药对象权利要求 3 所述的药物组合物。

10. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于所述要治疗或预防的由幽门螺旋菌感染引起的疾病和紊乱是慢性胃炎, 胃十二指肠溃疡, 胃远端腺癌, 胃淋巴瘤和胃癌。

11. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于对所述对象不施用抗幽门螺旋菌剂进行治疗。

12. 如权利要求 11 所述方法, 其特征在于所述抗幽门螺旋菌剂是质子泵抑制剂 (PPI), 甲硝唑, 甲红霉素-克拉霉素, 阿莫西林。

13. 如权利要求 5 所述方法, 其特征在于所述幽门螺旋菌是由质子泵抑制剂, 甲硝唑, 甲红霉素-克拉霉素, 阿莫西林治疗而诱发的耐受株。

14. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于所述化合物或其药物学上可接受的盐的给药途径是腔内, 皮下, 静脉内, 肌内, 皮内注射, 口服, 或局部给药。

15. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于还包括给所述对象进行幽门螺旋菌的诊断和预后的步骤。

16. 一种联合制剂, 包括如权利要求 1 所述的化合物或其药物学上可接受的盐和抗幽门螺旋菌剂。

17. 如权利要求 16 所述的联合制剂, 其特征在于所述抗幽门螺旋菌剂是指质子泵抑制剂, 甲硝唑, 甲红霉素-克拉霉素, 阿莫西林。

治疗或预防细菌感染的方法和组合物

技术领域

本发明涉及治疗或预防由某些细菌感染，尤其是幽门螺旋菌 (*H. pylori*)，和大肠杆菌(*E. coli*) 感染引起或伴随的疾病或紊乱的方法和组合物。

背景技术

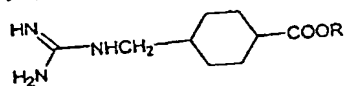
自从 20 世纪 40 年代抗生素商业化以来，由于它们消灭细菌又不损伤病人，被视为神奇的子弹。然而，随着时间的推移，大量抗生素不再有效，原因是对抗生素具有抗药性菌株的数量日益增长。结核病和肺炎的感染越来越变成不治，就象抗生素未发现以前一样。人类正面临一个全球性的公共健康危机。(Neu, *Science*, 257:1064-1073, (1992))

自从 1929 年发现青霉素以来，现在已有超过 150 种抗生素。它们分属于几大类，各有各的反应机理 (Lyon and Skurray, *Microbiol. Rev.*, 51:88-134, (1987))。一般说来，这些化合物由能抑制细菌生长和增殖的活有机体制造。例如，万古霉素和 β -内酰胺能阻断细菌细胞壁的合成 ((Chopra et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:497-503, (1997)); 和 (Nicolaou et al., *Scientific American*, 48-52 May (2001))。红霉素和四环素能干扰蛋白质的合成。磺胺干扰叶酸代谢，利福平能阻断核糖核酸的合成。喹诺酮抑制脱氧核糖核酸的复制。

为了克服细菌的抗药性，治疗细菌感染的新方法正在研发中。这些新方法包括对现有抗生素赋予新的生命，例如改变分子。最近，一类新的抗生素“自组装肽纳米管”引起人们兴趣 (Associated Press New, July 25, 2001)。这种化合物在显微镜下可观察到，由氨基酸环形成的管可穿过细菌表面。在基因组领域同样有许多新发展。他们干扰细菌的 RNA (rRNA) 和信使 RNA (mRNA) 的合成。被称作“体内表达技术”(IVET) 的新技术也在研究中，这种技术能标示细菌的基因。另外，一个有希望的方法是用反义寡核苷酸治疗细菌感染 (Jasny et al.,

Science, 286:443-491, (1999)。

有一类抗菌化合物已被鉴定，它们以一种特别的蛋白酶为靶的，该酶涉及 DNA 的合成 (Kato et al., Biol. Pharm. Bull., 16:120-124 (1998)); Irisawa et al., Biol. Pharm. Bull., 16:621-626 (1993); Kato et al., J. Enzyme Inhibition, 8:25-37 (1994); Kato et al., Eur. J. Biochem., 210:1007-1014 (1992) and Kato et al., Biol. Pharm. Bull., 16:552-557 (1993))。这类化合物由各种反式-4-胍甲环己烷羧酸 (GMCHA) 的芳香酯组成，在体外作为竞争性胰蛋白酶抑制剂，(见下列分子式 I):



幽门螺旋菌 (H. Pylori)，一种革兰氏阴性螺旋状细菌，1983 年首次由 Warren 和 Marshall 从一位慢性胃炎病人身上分离得到 (Warren et al., Lancet, 1:1273-1275 (1983))。许多证据显示胃十二指肠疾病和幽门螺旋菌之间有紧密联系。因此，认为幽门螺旋菌是一种重要的细菌病原体，诱发人类的慢性胃炎，胃十二指肠溃疡，胃远端腺癌和胃淋巴瘤。最近，世界卫生组织将幽门螺旋菌归为头号致癌物，在胃癌发展中起主导作用。 (International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, Lyon, France, Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 61:177-240, 1994)。

1994 年，美国国家健康署 (NIH) 推荐同时给药质子泵抑制剂 (PPI) 和抗菌剂根除幽门螺旋菌。 (Helicobacter Pylori in peptic ulcer disease: NIH consensus development panel on Helicobacter Pylori in peptic ulcer disease. (JAMA, 272:65-69 (1994)) 从那时起，口服质子泵抑制剂，甲硝唑，甲红霉素-克拉霉素，阿莫西林被引入实用，对感染病例达到 80-90% 的治愈率。然而，应用抗菌剂可引起一个严重问题，即诱发幽门螺旋菌对抗菌剂的耐受菌株。实际上，甲硝唑，甲红霉素-克拉霉素，阿莫西林的耐受菌株已屡见报道 (Zwet et al., Lancet, 352:1595 (1998))。服用质子泵抑制剂和抗菌剂引起的另一严重问题是质子泵抑制剂会诱发消化不良，大量抗菌剂则导致消化道内菌群的严重毁灭。

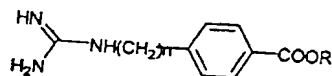
因此，找到消灭幽门螺旋菌的一类新化合物十分重要。本发明即针

01-09-25

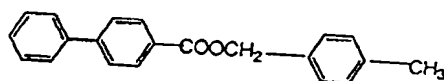
对此一需求及其相关技术。

发明内容

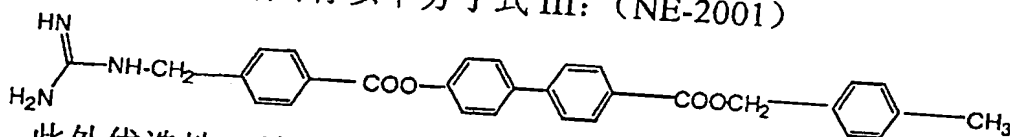
本发明通过提供能抑制某些细菌 DNA 的起始复制，增加了抗菌剂的成员。本发明一方面是涉及具有以下分子式 II 的化合物，或其药物学上可接受的盐：



其中 n 是 0-1 的整数，R 选自氢，C₁₋₁₀ 烷基，C₁₋₁₀ 芳基和

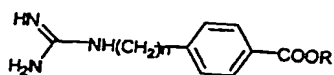


优选地，该化合物具有以下分子式 III：(NE-2001)

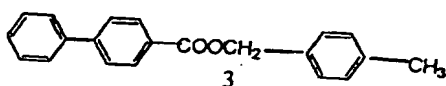


此外优选地，该化合物或其在药物学上可接受的盐是以药物组合物的形式，或单独，或与药物上可接受的载体和赋形剂联合提供。本发明还提供了包括上述化合物的药盒，用于治疗或预防由细菌感染，例如幽门螺旋菌感染和大肠杆菌感染或伴随感染导致的疾病或紊乱。

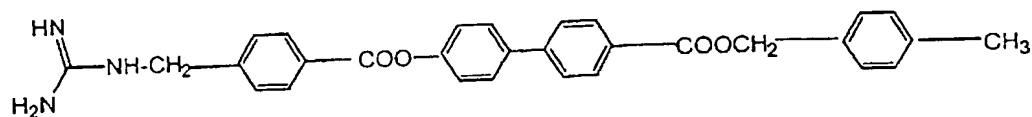
另一方面，本发明涉及治疗或预防由细菌感染引起或伴随的疾病和紊乱的方法。该方法包括对需要或愿意治疗或预防的对象，给予有效量的选择性地抑制细菌 DNA 复制起始的试剂或其药物学上可接受的盐，以治疗或预防上述疾病和紊乱。优选地，上述疾病或紊乱由幽门螺旋菌感染或大肠杆菌感染引起或伴随。另外优选地，由细菌感染，尤其是幽门螺旋菌感染和大肠杆菌感染引起或伴随的疾病和紊乱通过给药有效量的具有以下分子式 II 的化合物或其药物学上可接受的盐来治疗或预防：



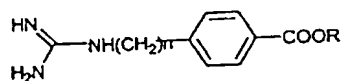
其中 n 是 0-1 的整数，R 选自氢、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 芳基和



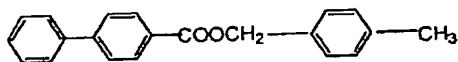
优选地，给药的化合物有以下分子式 III: (NE-2001)



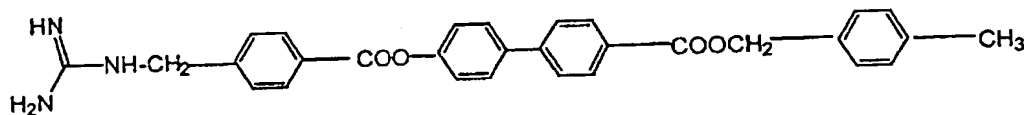
在另一方面，本发明涉及联合制剂，该联合制剂包括一种具有选择性地抑制细菌，尤其是幽门螺旋菌和大肠杆菌 DNA 的复制起始的制剂或其药物学上可接受的盐，和一种抗幽门螺旋菌和大肠杆菌的制剂。优选地，该联合制剂包括一种化合物或其药物学上可接受的盐和一种抗幽门螺旋菌制剂。该化合物具有以下分子式 II:



其中 n 是 0-1 的整数，R 选自氢、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 芳基和



更优选地，在联合制剂中的化合物具有以下分子式 III: (NE-2001)



本发明还提供了包括上述联合制剂的药盒。本发明还进一步提供了应用上述联合制剂治疗或预防由细菌感染，例如幽门螺旋菌感染和大肠杆菌感染引起或伴随的疾病和紊乱的方法和药盒。

附图说明

图 1 显示化合物 PH04 对同步化大肠杆菌细胞的细胞生长，DNA 合成和蛋白酶 In 活性的作用。

图 2 说明化合物 (NE-2001) 的抗幽门螺旋菌作用。

图 3 说明化合物 NE-2001 在不同 PH 值时的抗幽门螺旋菌作用。

具体实施方式

为了阐明发明内容且不受其局限，对发明分成以下几个小节进行详细描述。

A 定义

除非另有定义，本发明所用的技术和科学上的术语，与本发明所属领域的通用技术的一般理解具有相同意义。本处提到的来源于基因库和其他数据库的所有专利，申请，公布的申请，和其他出版物和序列被全面收入引用作为参考。如果本节阐明的定义与本专利参用的来源于基因库和其他数据库的所有专利，申请，公布的申请和其他出版物和序列被收入和引用的定义阐述相反，或不一致时，以本节阐明的定义为准。

本文所用，“一”或“一个”指“至少一个”或“一个或多个”

本文所用，“螺旋菌”指螺旋形的，卷曲的或直的，有圆形的末端和多鞘鞭毛，鞭毛末端有泡（单极的或双极和侧面的）的微需氧细菌属。它形成无色素的，半透明的菌落，通常直径 1-2 毫米。过氧化氢酶和氧化酶通常呈阳性。在灵长类，包括人和白鼬的胃粘膜内发现。在一些种属中，常伴随胃和消化性溃疡。

本文所用，“幽门螺旋菌”指螺旋菌属下的一种。它是一个 S 形或卷曲的革兰氏阴性菌，不形成孢子，可以是有鞭毛的。在人胃中发现，最早叫做幽门弯曲菌属。幽门螺旋菌感染产生脲酶，与包括胃炎和胃，十二指肠，消化性溃疡的数种胃十二指肠疾病伴随。

本文所用，“由幽门螺旋菌感染引起的疾病和紊乱”指由幽门螺旋菌感染单独引起的疾病和紊乱，或由遗传性和/或获得性的其他因素和条件共同引起。

本文所用，“大肠杆菌”指生化学家广泛用于实验室工作的原始型菌。它是棒状的革兰氏阴性杆菌。在哺乳动物大肠（结肠）中大量存在。正常状态下它是非病原体性的，但某些菌株例如大肠杆菌 O157 株，通常存在于牛类小肠中，最近导致若干病例死亡。

本文所用，“由大肠杆菌感染引起的疾病和紊乱”指由大肠杆菌感染，单独引起的疾病和紊乱，或由遗传性和/或获得性的其他因素和条件共同引起。

本文所用的用于治疗某一特定疾病的化合物的“有效量”指足够改善或在某种程度上减轻与此病相伴的症状的量。这一剂量可以单一剂量给药，也可按照治疗方案给药。这一剂量可治愈疾病，但典型的是

为了改善该症状而给药。为改善症状重复给药可能是需要的。

本文所用，“药物学上可接受的盐，酯或其他衍生物”包括领域技术人员用已知方法易于制备的任何盐，酯或衍生物。这样衍生和生成的化合物可对动物和人给药，不具有毒性作用。该化合物或是药物活性的，或是前体药物。

本文所用，“治疗”指疾病和紊乱的症状用任何方式得以改善，或其他有益的改变。治疗也包括本发明组合物在药物上的应用。

本文所用，给予某一特定药物组合物“改善”某一特定紊乱的症状是指任何减轻，无论永久的，临时的，长时期的，短暂的，都能归因于或与该组合物的施用有关。

本文所用，“基本上纯”是指足够均匀，通过本领域技术人员为评价纯度使用的标准分析方法探测不出杂质，所述标准分析方法有如薄层层析法（TLC），凝胶电泳和高效液相色谱法（HPLC）。或者足够纯也指即使进一步纯化也不能改变该物质可探测到的理化特性，例如酶和生物活性。用于纯化化合物制得基本上化学纯的方法，是本领域技术人员公知的。然而基本上化学纯化合物可以是立体异构体或同分异构体的混合物。在这种情况下，进一步纯化也许会增加化合物的比活性。

本文所用，“前体药物”是指一种体内给药的化合物，该化合物可被代谢，或转化为生物学上、药物学上或治疗上的活性形式。为了制造前体药物，药物活性化合物被修饰，使该活性化合物通过代谢过程再产生。药物前体可被设计成改变其代谢稳定性，或运输特性的前体，以掩盖其副作用或毒性，改良药物的味觉，或改变其他特性。凭借药代动力学及药物体内代谢的知识，一旦药物学上活性化合物为已知，本领域技术人员就可以设计出该化合物的前体药物。（参见，例如 Nogady Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392 (1985)）。

术语“基本上”相同或均匀或相似，按照本领域技术人员对相关技术的理解可在上下文有所改变，并且一般为至少 70%，优选为至少 80%，更优为至少 90%，最优为至少 95%相同。

这里所用的“组合物”指任何混合物。可以是溶液、混悬液、液体、

粉末、油膏、水性的、非水性的或它们的任何组合。

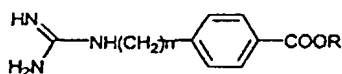
这里所用的“联合”指两种或多种之间的任何联合。

这里使用的术语“对象”包括人和动物，例如，狗，猫，牛，猪，啮齿动物等。有经验的实施者应可理解对象为适于愿意对由细菌感染，例如，幽门螺旋菌和大肠杆菌感染引起或伴随的疾病和紊乱进行治疗和预防。

这里使用的任何保护性基团，氨基酸和其他化合物的缩写，与它们通用的、公认的缩写或 IUPAC-IUB 委员会颁布生化命名一致，除非特别说明。(见 Biochem. 11:1726 (1972))。

B 抗菌剂

本发明通过提供对某些细菌抑制其 DNA 复制起始的药物，增添到抗菌剂系列中。本发明的一个方面涉及一种具有以下分子式 II 的化合物，或其药物学上可接受的盐：

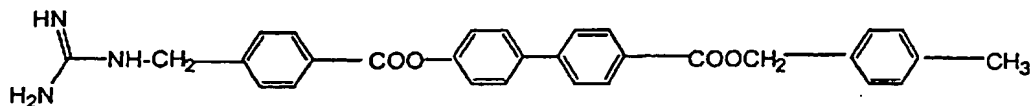


其中 n 是 0-1 的整数，R 选自氢、低级烷基，如 C₁₋₁₀ 烷基、低级芳基，如 C₁₋₁₀ 芳基和



低级烷基可以是任何合适的脂肪族基团，包括烷、烯、炔和环脂肪族基团。低级烷基可以是直的碳氢基团，或包括合适的取代基，例如：卤化物。低级芳基可以是直的碳氢基团，或可包括合适的取代基，例如：卤化物。

优选地，上述化合物具有以下分子式 III (NE-2001)



并且 R 基团优选地包含任何芳香基或酯。

本发明的化合物可以是一个特定的立体异构体，例如 R-或 S-构型，或它们的混合物，例如，外消旋混合物。这里考虑的化合物包括所有药物上活性的化合物种类，或其溶液或混合物。还包括其水合类型，

例如这些化合物的水溶液，水解产物或电离产物；且这些化合物可含有不同数量的结合水分子。

本发明的化合物可按照任何合适的方法来制备或合成。优选地，用以下面 F 节中引证的合成法制备该化合物。

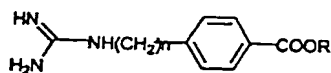
还有，优选地，该化合物或其药物学上可接受的盐以药物组合物的形式提供，或者单独，或者与一种药物学上可接受的载体或赋形剂结合。

本发明的化合物可用任何合适的酸以其药物学上可接受的盐的形式来制备。例如；无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸，等等均可使用。其他例子中，有机酸诸如甲酸、乙酸、丙酸、苯甲酸、马来酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸等等均可使用。另一个例子，烷基磺酸如甲基磺酸、乙基磺酸等等可使用。还有一个例子，芳基磺酸，例如苯磺酸，对甲苯磺酸等均可使用。

C 治疗和预防方法

在另一方面，本发明涉及治疗和预防由细菌感染引起的疾病和紊乱的方法，该方法包括对需要或愿意接受治疗或预防的对象给予有效量的选择性抑制细菌 DNA 复制起始的药剂或药物学上可接受的盐来防治或预防上述疾病和紊乱。

优选地，上述疾病和紊乱是由大肠杆菌或幽门螺旋菌引起或伴随的。还有优选地，通过给药上述对象有效量的具有下述分子式 II 的化合物或其药物学上可接受的盐，治疗或预防上述由细菌，尤其是大肠杆菌或幽门螺旋菌引起的疾病或紊乱：

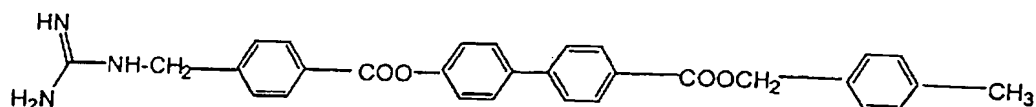


其中 n 是 0-1 的整数，R 选自 H，C₁—C₁₀ 烷基，C₁—C₁₀ 芳基和



可以使用任何合适的化合物或其药物学上可接受的盐，包括上述 B

节中描述的那些。优选地，给药的化合物具有以下分子式 III (NE—2001):



可以用本方法治疗任何对象，优选哺乳动物，更优选人。

本方法可用来防治任何由大肠杆菌或幽门螺旋菌感染导致的疾病和紊乱。优选的疾病是慢性胃炎、胃十二指肠溃疡、胃远端腺癌、胃淋巴瘤和胃癌。

本方法可用来防治或预防由任何埃希大肠杆菌株或幽门螺旋菌株引起的疾病。例如：可以治疗或预防由下述幽门螺旋菌株引起的疾病。

1: Wang et al., Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):926-34.

2: Peek RM Jr., . *Helicobacter pylori* strain-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Apr; 280(4):G525-30.

3: Israel et al., *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified y microarray, influence host inflammatory responses. *Clin Invest.* 2001 Mar; 107(5):611-20.

4: Vitkute et al., Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* train 26695. *Bacteriol.* 2001 Jan; 183(2):443-50.

5: DeLoney and Schiller, Characterization of an In vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec; 44(12):3368-73.

6: Hua et al., Isolation of a single strain of *Helicobacter pylori* from the antrum and body of individual patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Oct; 12(10):1129-34.

7: Occhialini et al., Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun.* 2000 Nov; 68(11):6240-9.

8: Fassbinder et al., Structural and functional analysis of the riboflavin synthesis genes encoding GTP cyclohydrolase II (ribA), DHBP synthase (ribBA), riboflavin synthase (ribC), and riboflavin deaminase/reductase (ribD) from *Helicobacter pylori* strain P1. FEMS Microbiol Lett. 2000 Oct 15; 191(2):191-7.

9: Enroth et al., *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Sep; 9(9): 981-5.

10: Petersen et al., Role of strain type, AGS cells and fetal calf serum in *Helicobacter pylori* adhesion and invasion assays. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000 Sep; 29(1):59-67.

11: Matsui et al., Recurrence of gastric ulcer dependent upon strain differences of *Helicobacter pylori* in urease B gene. Dig Dis Sci. 2000 Jan; 45(1):49-54.

12: Queiroz et al., Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a cagA-positive strain in children. J Infect Dis. 2000 Feb; 181(2):626-30.

13: Monteiro et al., Lipopolysaccharide structures of *Helicobacter pylori* genomic strains 26695 and J99, mouse model H. pylori Sydney strain, H. pylori P466 carrying sialyl Lewis X, and H. pylori UA915 expressing Lewis B classification of H. pylori lipopolysaccharides into glycotype families. Eur J Biochem. 2000 Jan; 267(2):305-20.

14: Peek et al., *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. Cancer Res. 1999 Dec 15; 59(24):6124-31.

15: Aspinall et al., A structural comparison of lipopolysaccharides from two strains of *Helicobacter pylori*, of which one strain (442) does and the other strain (471) does not stimulate pepsinogen secretion. Glycobiology. 1999 Nov; 9(11):1235-45.

16: Enroth et al., Occurrence of resistance mutation and clonal expansion in *Helicobacter pylori* multiple-strain infection: a potential risk in clarithromycin-based therapy. Clin Infect Dis. 1999 Jun; 28(6):1305-7.

17: Hua et al., Predominance of a single strain of *Helicobacter pylori* in gastric antrum. Helicobacter. 1999 Mar; 4(1):28-32.

01-09-25
18: van Doorn et al., *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun.* 1999 Jun; 67(6):3040-6.

19: van Doorn et al., The inflammatory response in CD1 mice shortly after infection with a CagA+/VacA+ *Helicobacter pylori* strain. *Clin Exp Immunol.* 1999 Mar; 115(3):421-7.

20: De Ungria et al., Molecular characterization and interstrain variability of pHPS1, a plasmid isolated from the Sydney strain (SS1) of *Helicobacter pylori*. *Plasmid.* 1999 Mar; 41(2):97-109.

在预防或治疗由幽门螺旋菌感染引起的疾病和紊乱时，可单独使用或与抗幽门螺旋菌剂联合使用本发明的化合物。任何合适的抗幽门螺旋菌剂均可与本发明的化合物联合使用。典型的抗幽门螺旋菌剂包括质子泵抑制剂（PPI），甲硝唑（metronidazole），甲红霉素-克拉霉素（clarithromycin），阿莫西林（amoxicillin）和法莫替丁（famotidine）（Gaschwantler et al., *EUR. J. Gastroenterol Hepatol*, 10(7):579-82.(1998)）。

在本发明的优选实施方案中，用本发明的化合物时不给药抗幽门螺旋菌剂例如 PPI，甲硝唑，甲红霉素-克拉霉素，阿莫西林和法莫替丁。更优选地，用本发明的化合物治疗或预防由 PPI，甲硝唑，甲红霉素-克拉霉素，阿莫西林和法莫替丁治疗诱导的抗药性幽门螺旋菌株引起的疾病和紊乱。

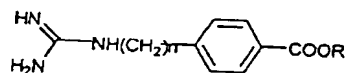
可以通过任何合适的方法单独给药本发明的化合物或与其他合适的抗幽门螺旋菌剂联合使用。例如，可以通过腔内注射，皮下注射，静脉内注射，肌内注射，真皮内注射，口服或局部给药本发明的化合物或其药物学上可接受的盐。

在一个具体实施方案中，本方法进一步包括对对象的幽门螺旋菌感染的诊断和预后（prognosing）。可以使用任何适合的方法用于诊断和预后幽门螺旋菌感染。诊断和预后可以基于检测和/或鉴定任何或所有的幽门螺旋菌的蛋白质，例如它的酶、抗原、抗体、核酸或其它病理性和临床标记物以及症状。例如，可以使用 WO 01/44815 和美国专利 5,571,674 揭示的诊断或预后方法。

D 联合制剂，药盒和联合用药的方法

另一方面，本发明也涉及联合制剂，这种联合包括一种对幽门螺旋菌或大肠杆菌选择性抑制其 DNA 复制起始的药剂，或其药物学上可接受的盐，和一种抗幽门螺旋菌或大肠杆菌剂。

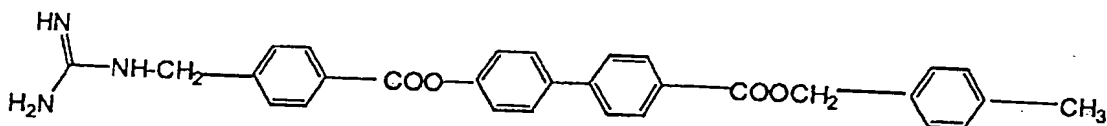
优选地，这种联合用药包括一种化合物或其药物学上可接受的盐和一种抗幽门螺旋菌剂，该化合物具有以下分子式 II：



其中 n 是 0-1 的整数，R 选自 H、C₁-C₁₀ 的烷基、C₁-C₁₀ 的芳基和



更优选地，联合制剂中包括的化合物具有以下分子式 III (NE-2001)：



在本发明的联合制剂中可以使用任何合适的抗幽门螺旋菌剂。在一个特定实施方案中，用于本发明联合制剂地抗幽门螺旋菌剂的 PPI，甲硝唑，甲红霉素-克拉霉素，阿莫西林，法莫替丁。

在另一个特定实施方案中，提供了一种治疗或预防由细菌感染，例如幽门螺旋菌，或大肠杆菌感染所引起的疾病或紊乱的方法，该方法包括对需要和愿意治疗或预防的对象给予有效量的上述联合制剂，或其药物学上可接受的盐，从而治疗或预防上述疾病。

在另一个特定实施方案中，提供了一个药盒，其包括本发明的化合物或其药物学上可接受的盐以及使用上述化合物或其药物学上可接受的盐来防治细菌，例如抗幽门螺旋菌或大肠杆菌感染引起的疾病或紊乱的使用说明。

在再一个实施方案中，提供了一个药盒，其包括上述联合制剂及使用所述联合制剂治疗或预防由细菌感染，例如幽门螺旋菌，或大肠杆

菌感染所引起的疾病或紊乱的使用说明。

E 配方和剂量

根据本发明，本发明的化合物，单独或与其它药剂，载体或赋形剂联合，为任何合适的给药途径制定制剂，例如腔内注射、皮下注射、静脉内注射、肌肉注射、真皮内注射、口服或局部用药。本方法可以使用注射给药制剂，其以单剂量的形式在安瓿或多剂量容器中与添加的防腐剂注射给药。制剂可采取以下形式如混悬液、溶液或在油性或水性媒介中的乳液。制剂可以含有配方试剂（formulatory agents）如混悬剂、稳定剂和/或分散剂。此外，使用前，活性成分可以粉末形式与合适的载体，无菌无热源水或其他溶剂构成。本发明的局部用药可采用泡沫，凝胶，软膏，油膏，转皮膜片，或膏状物。

本发明中可以使用的用于给药的药用组合物和方法包括，但不局限于，美国专利 5,736,154; 6,197,801 B1; 5,741,511; 5,886,039; 5,941,868; 6,258,374B1; 和 5,686,102 所报道的。

治疗或防治的剂量大小会因为病情的严重性和给药途径而有所变化。剂量和用药频度会因为年龄，体重，条件和个体病人反应不同而不同。

需要指出的是随诊医生也应当知道，由于毒性和副反应，何时和怎样终止，中断或调整治疗到低剂量。相反，如果临床反应不够（排除毒性和副反应），医生应当知道何时和怎样调整治疗，提高剂量。

任何合适的给药途径均可被采用。剂型包括片剂，锭剂，豆状胶囊，分散剂，悬浮剂，溶液，胶囊，膜片及类似物。参见，雷明顿的药物科学（Remington's Pharmaceutical Sciences.）

在实际应用中，本发明的化合物，单独或与其他制剂联合，可以按照一般药物学混合技术与药物载体或赋形剂，例如 β -环糊精和 2-羟基-丙基- β -环糊精紧密混和。载体可根据投药的需要，采用广泛的形式，局部或非肠道途径的形式。制备非肠道剂型，例如静脉内注射或灌输的组合物，可采用类似的药物媒质，本领域技术人员公知的水，乙二

醇，油，缓冲剂，糖，防腐剂，脂质体等。这种非肠道组合物的例子包括，但不限制于 5%W/V 的右旋糖，正常盐水或其他溶液。本发明的化合物的总剂量，单独或和其他制剂联合给药，可用小瓶静脉注射液给药，体积大约从 1ml 到 2000ml。根据给药的总剂量，稀释液量也会不同。

本发明还提供了实现治疗方案的药盒。该药盒将治疗有效量的本发明的化合物以药物学上可接受的形式单独或与其他试剂联合，包含在一个或多个容器中。优选的药物形式是与无菌盐水，右旋糖溶液，缓冲溶液，或其他药物学上可接受的无菌液体合用。或者，组合物可被冻干或干燥；在这种情况下，药盒任选地进一步将一种药物学上可接受的溶液，优选无菌的溶液包含在一个容器中，以重新组成复合物形成用于注射目的溶液。典型的药物学上可接受的溶液是盐溶液和右旋糖溶液。

在另一个实施方案中，本发明的药盒进一步包含用于注射组合物的优选以无菌形式包装的针或针筒和/或包装的酒精垫。可任选地包括医生或患者用于给药组合物的说明。

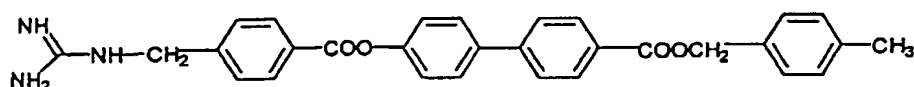
F 实施例

实施例 1. 新型抗幽门螺旋菌化合物系列的合成

自 1983 年在慢性胃病病人的胃黏液中发现幽门杆菌以来，科学家们已对其进行了详尽的研究。结果表明，幽门杆菌可导致胃及十二指肠溃疡。

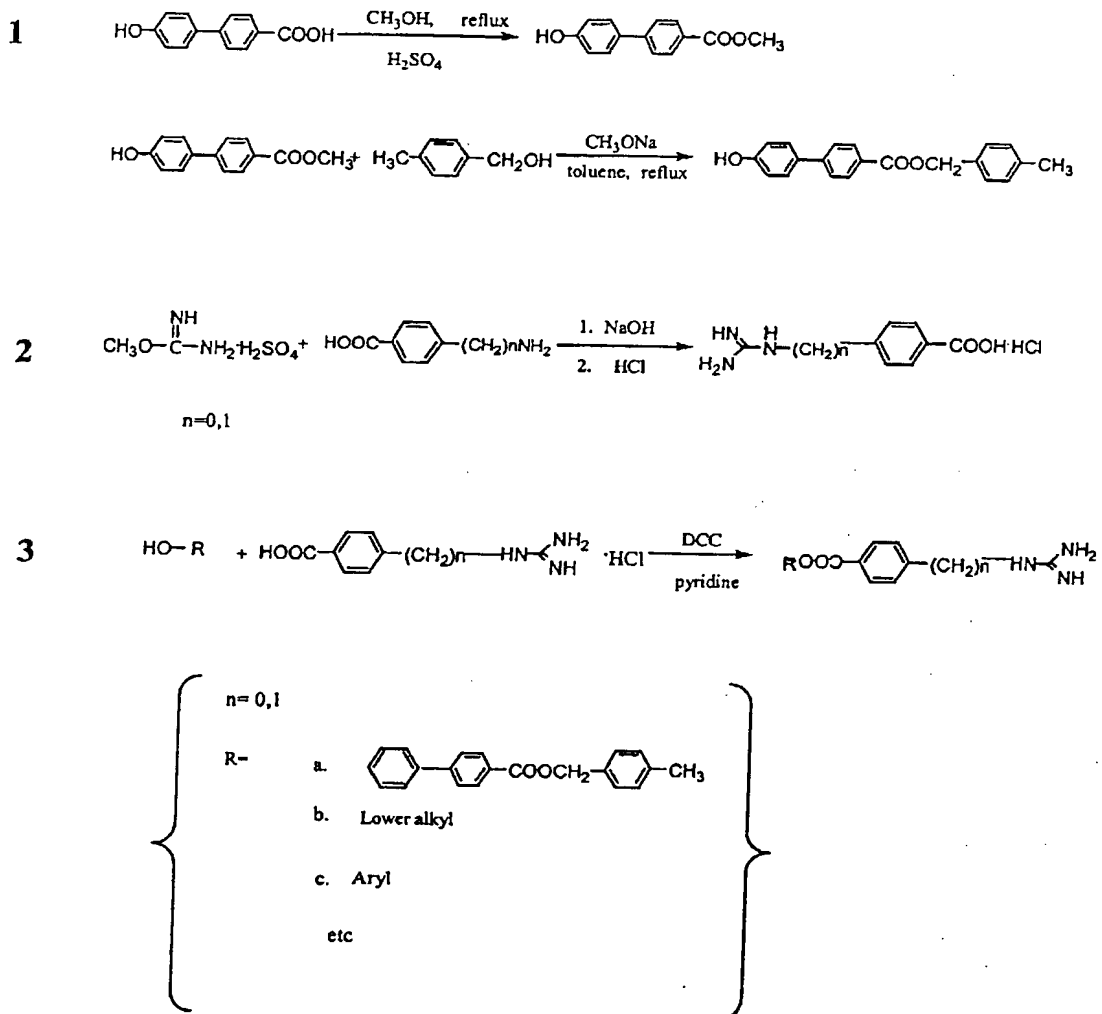
在世界范围内大约有 60% 的人群感染了幽门杆菌，并已成为胃肠疾病中最常见的感染。研究证明，一部分人会由此发展为胃炎，消化性溃疡甚至胃癌。由于它是一种螺旋型、外被厚壳，外壳有可帮助其自由移动的纤毛，使其非常适应胃肠上部的环境，且极难被根除。

我们致力于研发系列化合物，发现化合物 NE-2001 可高效、选择性的作用于幽门杆菌



从而可用于更高效价比的多种药的疗法。

合成线路



实验

实验仪器及试剂

HP1100 HPLC 系统，具二元梯度泵，在线真空脱气机，自动进样器，柱温箱，光二极管阵列检测器。色谱柱为 ZORBAX ODS (4.6*250mm)，流动相为甲醇/水=90:10 (0.1%乙酸)，流速为 1mL/min，检测波长为 254nm。

所有溶剂为 HPLC 级。MS 图谱由 PE API 2000 LC/MS/MS 质谱分析仪测得。

¹H-NMR 数据由华东理工大学分析测试中心测得。所有合成起始原料均为市售产品。

4-(4-甲基苄基)-4'-羟基联苯-4-甲酸酯 (carboxylate) 的合成

4-甲基-4'-羟基联苯-4-甲酸酯

在装有充有 A4 分子筛的索氏提取器的反应瓶中，加入 21.4g (0.1 mol) 4-(4-羟基苯)苯甲酸，甲醇 500 mL。滴加 2mL 浓硫酸，加热回流 72 小时。真空去除溶剂后，油状剩余物溶于甲苯 100mL 中，水洗至 pH=7。有机层用无水硫酸镁干燥并过滤。滤液中加入适量活性炭，然后加热回流 10-15min，并过滤。去除溶剂，得 4-甲基-4'-羟基联苯-4-酯白色结晶物 18.2g (产率 80%)。

4-(4-甲基苄基)-4'-羟基联苯-4-甲酸酯

反应瓶中，加入 9.0g(40.0mmol) 4-甲基-4'-羟基联苯-4-甲酸酯，24.4(200.0mmol)4-甲基苄醇，1.0g(4.0mmol)甲醇钠和 20.0ml 甲苯，在氮气保护下，加热回流 2.5 小时。在反应期间，另外再加入 20.0ml 甲苯，以带出反应生成的甲醇。反应毕，冷却至室温，加入 10ml 乙酸和 40g 冰调至 pH=5，分出有机层，减压回收溶剂和过量的 4-甲基苄醇。冷却得棕色油状物，放置缓慢结晶，得粗晶，用甲苯/正己烷重结晶，得白色结晶体 7.3g (产率 71%)。

¹H-NMR(500MHz,CDCl₃): δ2.35(s, 3H), 5.35(s, 2H), 6.90(d, 2H), 7.15(d, 2H), 7.35(d, 2H), 7.50(d, 2H), 7.60(d, 2H), 8.10(d, 2H)

4-胍烷基苯甲酸盐酸盐的合成

4-胍甲基苯甲酸 盐酸盐

于冰浴冷却下，将 72ml 2N NaOH 溶液加入 20.0g(0.14mol)甲基异硫脲的硫酸氢盐和 36 ml 水的溶液中并搅拌。滴加 21.0g(0.138mol)4-氨基苯甲酸和 2N NaOH 140ml 的溶液。将混合物在室温下静置过夜，然后于冰浴中冷却 1 小时。过滤出沉淀的白色晶体并用冷水洗涤白色晶体。将滤出物溶解于热的 1N HCl 溶液并由过滤去除不溶物。将溶液在真空中浓缩至结晶。冷却溶液结晶出无色棱晶，随后过滤干燥得 4-胍甲基苯甲酸盐酸盐 22.1g (收率 70%)。

LC/MS=194 (M+H)

4-胍基苯甲酸 盐酸盐

于冰浴冷却下，将 36ml 2N NaOH 溶液加入 10.0g(0.07mol)甲基异硫脲的硫酸氢盐和 36 ml 水的溶液中并搅拌，然后滴加 9.5g(0.069mol)4-氨基苯甲酸和 70ml 2N NaOH 的溶液。在室温下静置过夜，然后于冰浴中冷却 1 小时。过滤出沉淀的白色晶体并用冷水洗涤滤出物。随后将滤出物溶解于热的 1N HCl 溶液中并过滤去除不溶物。将溶液在真空中浓缩至结晶。冷却溶液结晶出无色棱晶，随后过滤干燥得 4-胍基苯甲酸盐酸盐 10.0g (收率 67%)。

LC/MS=180 (M+H)

4-胍烷基苯甲酸酯的合成

4-(4-甲基苄基)-4'-[胍甲基苯甲酰氧基]联苯-4-甲酸酯 盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 2.42g(0.010mol) 4-甲基苄基-4'-羟基联苯基-4-甲酸酯，2.3 克(0.010mol) 4-胍甲基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.020mol)DCC ((二环己基羰基二酰亚胺) dicyclohexylcarbodiimide) 的悬浮液，于室温下搅拌 48 小时后，过滤除去不溶物。滤液蒸发至干并用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 和乙醚 (50ml) 处理残余固体，随后，再次用乙醚洗涤水层并浓缩至 20ml。于乙醇/己烷中重结晶，得 4-(4-甲基苄基)-4'-[胍甲基苯甲酰氧基]联苯-4-甲酸酯 盐酸盐 2.9g(收率 55%)。

LC/MS=494(M+H)

4-(4-甲基苄基)-4'-[胍基苯甲酰氧基]联苯-4-甲酸酯 盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 2.42g(0.010mol) 4-甲基苄基-4'-羟基联苯基

4-甲酸酯, 2.2 克(0.010mol) 4-胍基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.020mol)DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时后, 过滤除去不溶物。滤液蒸发至干后, 将残余固体用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 和乙醚 (50ml) 处理。随后, 再次用乙醚洗涤水层并浓缩至 20ml。于乙醇/己烷中重结晶, 得 4-(4-甲基苄基)-4'-[胍基苯甲酰氧基] 联苯-4-甲酸酯 盐酸盐 3.0g(收率 60%)。

LC/MS=482(M+H)

4-苄基-4'-胍甲基苯甲酸酯盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.0g(0.011mol) 苯酚, 2.3 克(0.01mol) 4-胍基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.020mol) DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 滤液蒸发至干, 将残余固体用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml。过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 得 4-苄基-4'-胍甲基苯甲酸酯 盐酸盐 2.3g(收率 75%)。

LC/MS=269(M+H)

4-苄基-4'-胍基苯甲酸酯 盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.0g(0.011mol) 苯酚, 2.2 克(0.01mol) 4-胍基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.02mol) DCC, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 滤液蒸发至干, 并将残余固体用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml, 过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 得 4-苄基-4'-胍基苯甲酸酯 盐酸盐 2.2g(收率 75%)。

LC/MS=255(M+H)

4-(4-联苯基)-4'-胍甲基苯甲酸酯 盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.7g(0.01mol) 4-苄基苯酚, 2.3 克(0.01mol) 4-胍甲基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.02mol) 克 DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 将滤液蒸发至干, 用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理残余固体, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml, 过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 得 4-(4-联苯基)-4'-胍甲基苯甲酸酯 盐酸盐 2.5g(收率 65%)。LC/MS=346(M+H)

4-(4-联苯基)-4'-胍基苯甲酸酯盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.7g(0.01mol) 4-苯基苯酚, 2.2 克(0.01mol) 4-胍基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.02mol) 克 DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 滤液蒸发至干, 用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理残余固体, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml, 过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 得 4-(4-联苯基)-4'-胍基苯甲酸酯盐酸盐 2.6g(收率 70%)。LC/MS=332(M+H)

4-(4-甲基苯基)-4'-胍甲基苯甲酸酯盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.1g(0.01mol) 4-甲基苯酚, 2.3 克(0.01mol) 4-胍甲基苯甲酸盐酸盐和 4.1 克(0.02mol) DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 滤液蒸发至干, 用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理残余固体, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml, 过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 4-(4-甲基苯基)-4'-胍甲基苯甲酸酯盐酸盐 2.4g(收率 75%)。LC/MS=284(M+H)

4-(4-甲基苯基)-4'-胍基苯甲酸酯盐酸盐

在 150ml 吡啶中加入 1.1g(0.01mol) 4-甲基苯酚, 2.2 克(0.01mol) 4-胍基苯甲酸盐酸盐和 4.1(0.02mol) 克 DCC 的悬浮液, 于室温下搅拌 48 小时。过滤除去不溶物后, 滤液蒸发至干, 用 0.1N HCl 溶液 (50ml) 处理残余固体, 用乙醚洗涤。随后, 将水层浓缩至 20ml, 过滤产物结晶体, 用异丙醇/异丙醚洗涤粗品, 得 4-(4-甲基苯基)-4'-胍基苯甲酸酯盐酸盐 2.2g(收率 73%)。LC/MS=270(M+H)

参考文献:

1. 美国专利 4,348,410
2. 有机化学月报 33 卷(1985) 652
3. 药物合成反应 闻韧主编 化学工业出版社
4. 有机药物合成法 陈芬儿主编 中国医药科技出版社

实施例 2. GMCHA 衍生物的活性

发现 GMCHA 的不同修饰对大肠杆菌生长有不同抑制作用 (表 1)。例如, 苯酯 (PH01) 衍生物对大肠杆菌生长抑制作用的 $IC_{50} > 200 \mu M$, 在 4-甲基苯基 (PH02), 4-乙基苯基 (PH03), 4-叔丁苯基 (PH04) 和 4-联苯基 (BP01) 的不同修饰中 IC_{50} 分别从 >200 减少到 167, 到 45,

$26 \mu\text{M}$ 。重要的是, 这些化合物的作用不局限于大肠杆菌(Irisawa et al., Biol. Pharm. Bull., 16:1211-1215 (1993); and Kato et al., J. Enzyme Inhibition, 8:25-37 (1994))。无论靶细胞是大肠杆菌, 还是枯草杆菌, 还是金色葡萄球菌, 还是表皮葡萄球菌, 这类分子个别成员的相对作用是相同的(表2)。对每种细菌, 最有效的化合物是4-联苯基(BP01)衍生物。有趣的是, 特定化合物的 IC_{50} 对于不同细菌种属却有很大不同, 被测对象间几乎达到2个数量级的差异。对于4-联苯基(BP01)酯, 例如, 葡萄球菌似乎比杆菌敏感1个数量级。而杆菌又比大肠杆菌敏感1个数量级。

表1. GMCHA 衍生物对大肠杆菌的生长和蛋白酶 In 活性的影响









表 1. GMCHX 衍生物对大肠杆菌生长和蛋白酶抑制作用					
化合物	结构	大肠杆菌生 长 IC ₅₀ (μ M)	大肠杆菌蛋 白酶 In IC ₅₀ (μ M)	胰蛋白酶 K _i (μ M)	
PH01	苯基		>200	>200	110
PH02	4-甲苯基		>200	>200	78
PH03	4-乙苯基		167	>200	48
PH04	4-叔-丁苯基		45	38	64
PH05	2,4-二氯苯基		92	62	46
PH06	2,4,6-三氯苯基		44	35	273
BP01	4-联苯基		26	17	54
BP02	2-联苯基		74	83	187

表2. 各种 GMCHA 芳香酯对不同细菌生长的作用






化合物	结构	大肠杆菌		枯草杆菌		金色葡萄球菌		表皮葡萄球菌	
		IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}
PH01	苯基		>200	>200	>200	>200	151	>200	128
PH02	4-甲苯基		>200	>200	>200	>200	47	120	48
PH03	4-乙苯基		167	>200	129	>200	15	50	14
PH04	4-叔-丁苯基		45	90	26	50	3.4	15	2.9
BP01	4-联苯基		26	40	4	10	0.6	2	0.4

图1说明 GMCHA 衍生物对大肠杆菌同步化细胞的细胞生长, DNA 合成, 以及蛋白酶 In 活性的影响。图左, 没有 PH04 化合物时的同步

化细胞的生长。(a), 活细胞数目和 $[^3\text{H}]$ 胸苷摄入每间隔 5 分钟测定一次, 蛋白酶 In 活性每 30 秒间隔测定一次, 细胞分化第一次出现设定为零时间。(b) 和 (C), 蛋白酶 In 活性分别在-30 和 +30 分钟出现。P, Q 和 R 分别表示细胞分裂期, 细胞分裂和染色体复制起始之间的间隔, 染色体复制起始和细胞分裂的间隔期。图右, PH04 化合物 27 μM 存在时的同步化细胞生长。(a), -8 分钟时加抑制剂 (箭头)。样品描述如上。注意, 在没有 PH04 存在时, P, Q, R1, R2 分别是 15, 15, 15 和 10 分钟, 而有 PH04 存在时, DNA 合成起始在 30 分钟, DNA 合成活性加倍到 65 分钟。R1 从 15 分钟延长到 35 分钟。(b), 蛋白酶 In 活性在 30 分钟时出现, 但半衰期延长。

由于 GMCHA 衍生物开始时作为体外胰蛋白酶的合成抑制剂, 因此我们研究是否用荧光底物 Boc-Val-Pro-Arg-NH-Mec 能在大肠杆菌提取物中检测到类胰蛋白酶活性(Kato et al., *Eur. J. Biochem.*, 210:1007-1014 (1992))。我们检测到单一活性, 并把它纯化到均一。经八步纯化了 2880 倍, 收率为 15%。纯化的酶分子量约 66kDa, 等电点 4.9。根据最适 PH, 对各种合成底物的水解活性, 以及各种已知蛋白水解酶抑制剂对活性的影响, 这种大肠杆菌蛋白酶比哺乳动物胰蛋白酶和任何已知细菌酶有许多不同的特性。最令人鼓舞的是, 发现各种 GMCHA 衍生物对纯化酶的敏感性, 恰与它们对大肠杆菌的抑制作用平行 (表 1)。这一发现说明这种蛋白酶在大肠杆菌细胞内可能是这类生长抑制剂的靶分子。我们已经证明, 在同步化大肠杆菌细胞中, 这种蛋白酶的表达恰在染色体 DNA 复制起始之前 (图 2 左) (Kato et al., *Biol.Pharm. Bull.*, 16:552-557 (1993))。而且, 在 DNA 合成起始以后加入 4-叔丁苯基 (PH04) 衍生物, 不影响本轮细胞分裂, 但使下一轮细胞分裂延后。然而, 在 DNA 合成起始以前加入抑制剂, 可导致本轮细胞分裂时间延长 (图 1 右)。总之, 这些结果表明, 这种蛋白酶可能直接参与大肠杆菌染色体 DNA 的复制起始, 并且是 GMCHA 芳香酯抑制作用的靶分子。我们命名这种酶蛋白酶为蛋白酶 In, 它的基因和 prlC 基因相同。PrlC 基因编码 67kDa 蛋白质, 具有两个活性中心, 分别为蛋白酶 In 和寡肽酶 A (Jiang et al., *J. Biochem.*, 124:980-985 (1998))。从枯草杆菌中也部分纯化到类似蛋白酶 In 蛋白酶, 也被各种 GMCHA 的酯强烈抑制, 其抑制

作用也与抑制细菌生长相关联 (Irisawa et al., Biol. Pharm. Bull., 16:1211-1215 (1993)).。这些结果有力地表明, 蛋白酶 In 和类蛋白酶 In 普遍存在于各种细菌中, 它们的强抑制剂可作为新型抗菌剂。

实施例 3. NE-2001 的活性

这里说明的新化合物 NE-2001 应为 4-(4-甲基苄基)-4'-[胍甲基苯甲酰氧基]联苯-4-甲酸酯, 专一地抑制幽门螺旋菌的生长, 可在各种 pH 下根除幽门螺旋菌。

检测了几种物质对 9 株幽门螺旋菌 (ATCC43504, ATCC43629, ATCC43526, ATCC43579, ATCC49503, ATCC51110, ATCC51652, ATCC51653, ATCC51932) 的最小抑制浓度 (MIC) ($\mu\text{g/ml}$), NE-2001 的最小抑制浓度 (MIC) 从 0.10 到 0.48 $\mu\text{g/ml}$ 。总结在表 3 中。

表 3

化合物	MIC 范围($\mu\text{g/ml}$)
NE-2001	0.10-0.48
阿莫西林	0.01-0.08
甲红霉素-克拉霉素	0.01-0.90
甲硝唑	0.65-2.45

图 2 表明化合物 NE-2001 的抗幽门螺旋菌作用在不同浓度下 (从 0.15 到 2.50 微克/毫升) 测定杀菌作用 168 小时。图 2 显示代表性曲线。NE-2001 显示很强的抗幽门螺旋菌作用。1.25 微克/毫升以上浓度, 3 小时内未测到可见的活细菌。NE-2001 显示在所有测试的 PH 范围 (pH 3-7) 内, 具有抗幽门螺旋菌作用 (见图 3)。图 3. 表明在各种 pH 条件下, NE-2001 的抗幽门螺旋菌作用。

测定对 NE-2001 的天然抗性突变的显示频率见表 4。在各种测定浓度 (从 0.30 到 1.20 微克/毫升) 下, 显然未出现对 NE-2001 具有天然抗性的菌株。

表 4. NE-2001 的天然抗性突变频率

菌株	NE-2001 的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	频率
抗幽门螺旋菌 ATCC43504	0.30	$< 3.4 \times 10^{-8}$
	0.60	$< 3.4 \times 10^{-8}$
	1.20	$< 3.4 \times 10^{-8}$

进行了雄鼠口服 NE-2001 单一剂量的毒性研究，在每公斤体重 NE-2001 2000 毫克(制备 0.5%甲基纤维素混悬剂的最大剂量)剂量下，没有动物死亡，所有动物体重均有增加。没有一例发现一般毒性，显然 NE-2001 是安全的。(表 5)

表 5. 单剂量 NE-2001 对小鼠的毒性

动物种/属/年龄	小鼠/Slc: ddY/6 周
给药途径	口服
性别	雄性
动物数/组	5
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000

上述例子仅作为说明的目的，本发明的范围并不受此限制。对本领域的技术人员来说进行修改是显而易见的，本发明仅受所附权利要求范围的限制。

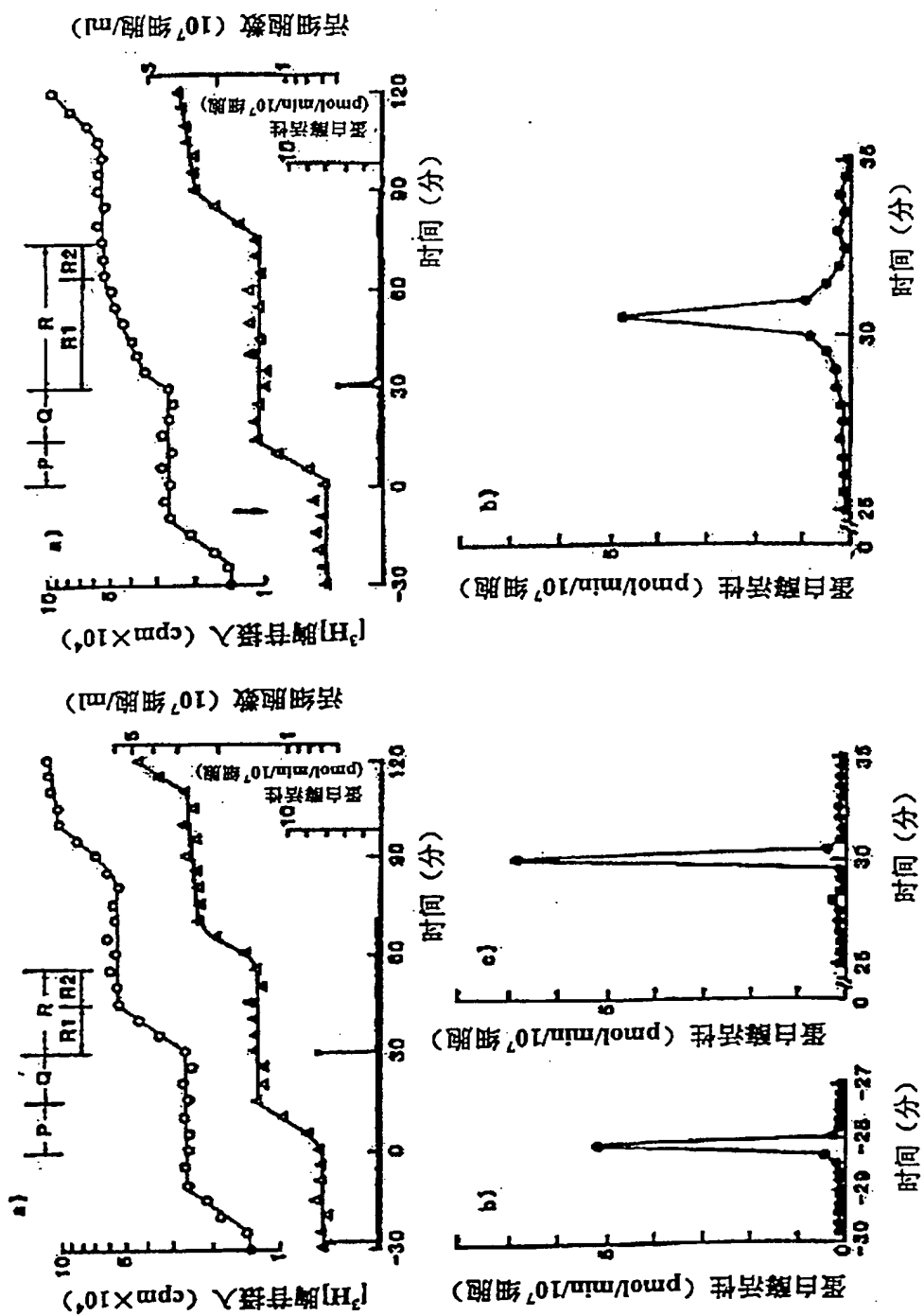


图 1

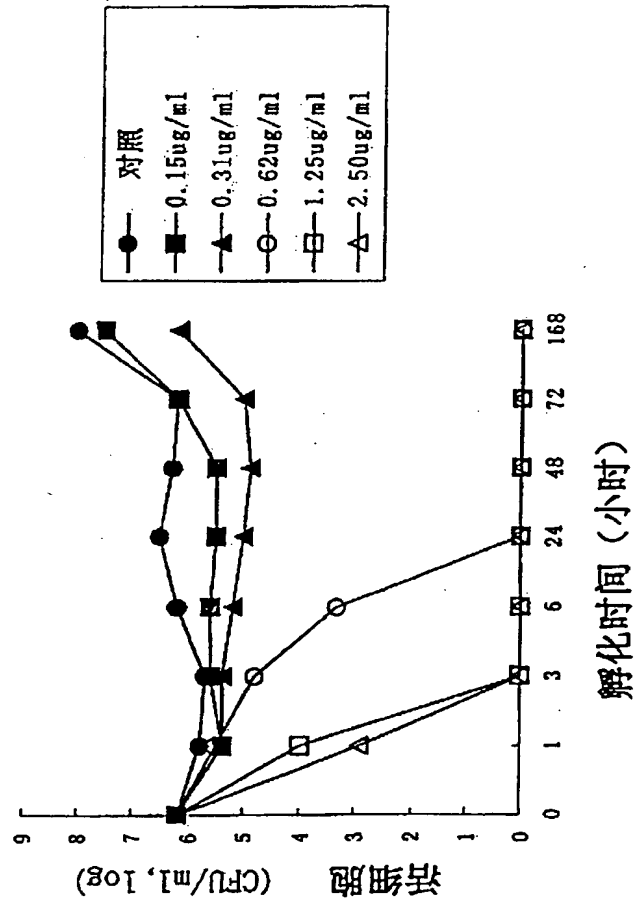


图 2

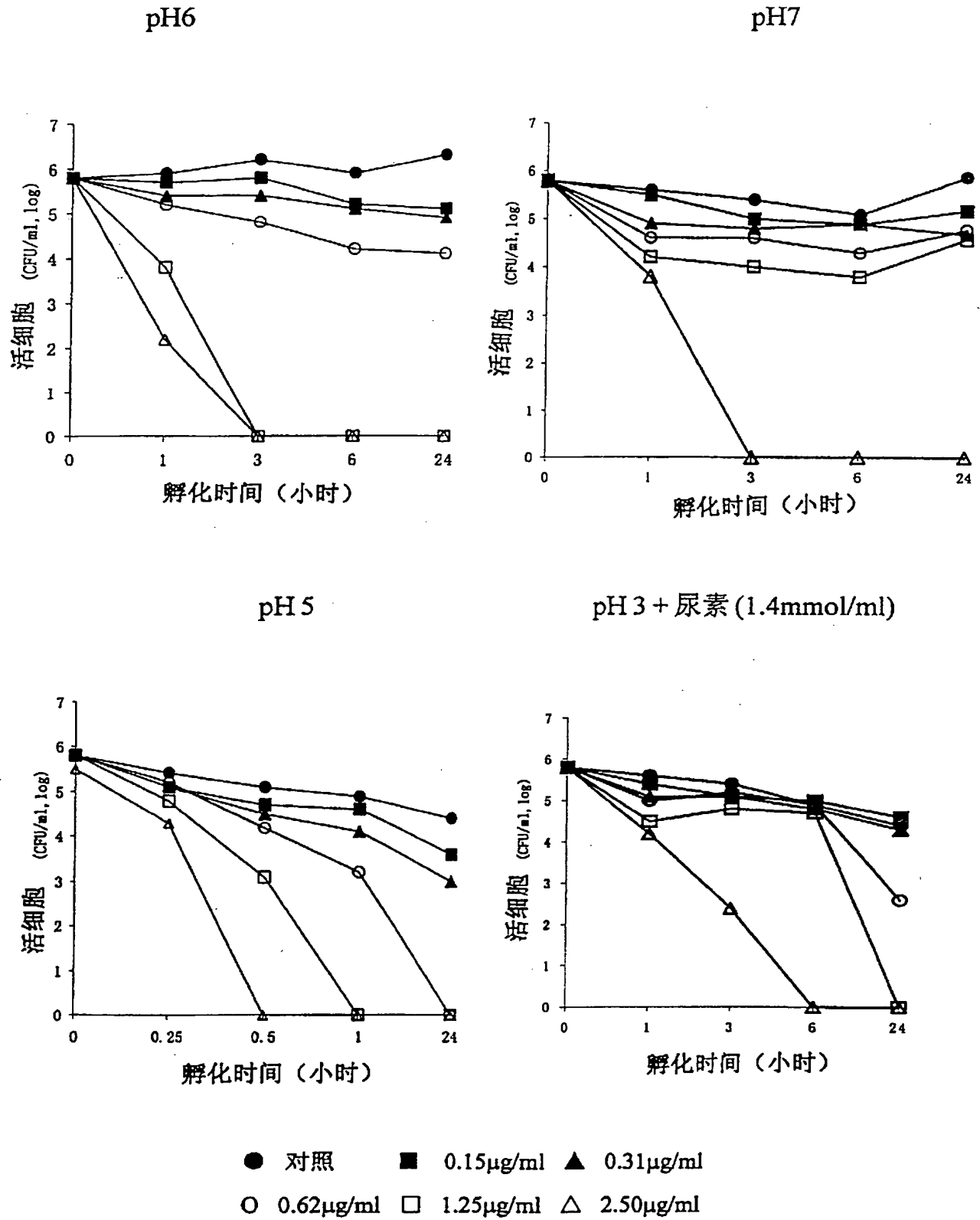


图 3